

**This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C12N 5/10, 15/62, C07K 19/00, 14/715, 14/72</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO97/32971</p> <p>(43) 国際公開日 1997年9月12日(12.09.97)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP97/00687</p> <p>(22) 国際出願日 1997年3月5日(05.03.97)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平8/47796 1996年3月5日(05.03.96) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 ディナベック研究所 (DNAVEC RESEARCH INC.)[JP/JP] 〒305 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 Ibaraki, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 小澤敬也(OZAWA, Keiya)[JP/JP] 〒329-04 栃木県河内郡南河内町祇園3-1-3 C-201 Tochigi, (JP) 伊藤克久(ITO, Katsuhisa)[JP/JP] 坂田恒昭(SAKATA, Tsuneaki)[JP/JP] 上田泰次(UEDA, Yasuji)[JP/JP] 長谷川護(HASEGAWA, Mamoru)[JP/JP] 〒305 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 株式会社 ディナベック研究所内 Ibaraki, (JP)</p>		<p>(74) 代理人 弁理士 清水初志(SHIMIZU, Hatsushi) 〒300 茨城県土浦市御町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ARIPO特許 (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54) Title: GENE THAT IMPARTS SELECTIVE PROLIFERATIVE ACTIVITY</p> <p>(54) 発明の名称 選択的増殖性を付与する遺伝子</p> <p>(57) Abstract It has become possible to amplify cells selectively by introducing thereto a gene coding for a fusion protein containing (a) a region to which a ligand binds, (b) a region which causes association when a ligand binds to the region (a) and (c) a region which imparts the cells a proliferative activity when the association occurs, and giving the cells ligand stimulation.</p>		

(57) 要約

(a) リガンドが結合する領域、(b) (a) の領域にリガンドが結合すると
会合する領域、及び(c) 会合すると細胞に増殖活性を付与する領域、を含む融
合タンパク質をコードする遺伝子を細胞に導入し、該細胞にリガンド刺激を与え
ることにより、該細胞を選択的に増幅させることが可能となった。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	EE	エストニア	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
AM	アルメニア	ES	スペイン	LS	レソト	SD	スーダン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
AU	オーストラリア	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SG	シンガポール
AZ	アゼルバイジャン	GB	イギリス	LV	ラトヴィア	SI	スロベニア共和国
BB	バルバドス	GE	グルジア	MC	モナコ	SK	スロバキア共和国
BE	ベルギー	GR	ギリシャ	MD	モルドバ	SN	セネガル
BG	ブルガリア	HN	ホンジュラス	MG	マダガスカル	SZ	スワジランド
BJ	ベナン	IE	アイルランド	MK	マケドニア共和国	TD	チャド
BM	バハマ	IT	イタリア	ML	マリ	TG	トーゴ
BO	ボリビア	RU	ロシア連邦	MN	モンゴル	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	US	アメリカ合衆国	MR	モーリタニア	TR	トルコ
CA	カナダ	JP	日本	MW	モザンビーク	TT	トリニダード・トバゴ
CC	ココス(キリング)諸島	KE	ケニア	MX	メキシコ	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	KR	大韓民国	NE	ニジェール	UG	ウガンダ
CH	スイス	RU	ロシア連邦	NL	オランダ	US	米国
CI	コート・ジボワール	UA	ウクライナ	NO	ノルウェー	UZ	ウズベキスタン共和国
CM	カメルーン	GB	イギリス	NZ	ニュージーランド	VN	ベトナム
CN	中国	DE	ドイツ	PT	ポルトガル	YU	ユーゴスラビア
CO	コロンビア	DK	デンマーク	RO	ルーマニア		

明細書

選択的増殖性を付与する遺伝子

技術分野

本発明は、遺伝子工学分野、特に遺伝子治療の分野に関する。

背景技術

先天的又は後天的に遺伝子に欠陥があるために発症する病気、即ち、遺伝子疾患に対しては、これまで様々な治療法が考えられてきた。その一つとして、欠陥遺伝子そのものを正常な遺伝子と入れ換えたり、正常な遺伝子を補ったりすることにより、遺伝子疾患を根本的に解決しようとするのが、遺伝子治療である。この遺伝子治療に当たって重要なことは、正常な遺伝子を標的細胞に正確に導入すると共に、導入した遺伝子を正確に発現させることである。正常な遺伝子を標的細胞に導入するための遺伝子のベクターとしては、これまで、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター等のウイルスベクターや、リボソーム等に代表される非ウイルスベクターが用いられてきた。しかし、いずれも標的細胞への遺伝子の導入効率が低い等の欠点が存在した。また、導入された遺伝子の発現効率が悪い等の欠点もあったため治療に不十分な場合が多かった。この場合でも、アデノシンデアミナーゼ（ADA）欠損症のように、正常ADA遺伝子が導入された細胞が生存優位性（survival advantage）あるいは増殖優位性（growth advantage）を獲得し、体内で次第に選択され優位になっていくものと期待されるものであれば、たとえ遺伝子導入効率が低くても次第に治療効果が現れるようになっていく可能性がある。しかし、このような体内での選択性が期待できないタイプの治療用遺伝子を導入する必要のある場合も多く、遺伝子を導入した細胞を選択的に増幅させるシステムの確立が望まれていた。

ところで、G-CSFは、好中球を選択的に増殖させるサイトカイン（造血因子）として従来から考えられてきたが、近年、G-CSFを投与すると、好中球の増加がみられるばかりでなく、造血幹細胞／前駆細胞の体内プールの増加がみられることが

報告された（臨床血液., 35, 1080(1994)）。また、G-CSFが機能する機構として、G-CSF刺激によりG-CSF受容体が活性化されるときには、G-CSF受容体の二量体化がみられること（Proc Growth Factor Res., 3(2), 131-141(1991)）や、G-CSF受容体には、増殖誘導ドメインと分化誘導ドメインが存在することが報告された（Cell., 74, 1079-1087(1993)）。さらに、G-CSF受容体同様、二量体化により活性化する受容体としては、エストロゲン受容体が知られており（J Biol Chem., 264, 2397-2400(1989)）、細胞内でエストロゲン受容体とc-Ablチロシンキナーゼの融合タンパク質を発現させることによりc-Ablチロシンキナーゼの活性化が起こることも報告された（The EMBO Journal., 12, 2809-2819(1993)）。

発明の開示

本発明は、治療用遺伝子を導入した造血幹細胞等を体内あるいは体外で選択的に増幅させることにより、遺伝子導入効率が低いという問題点を克服することを狙ったもので、造血幹細胞等を標的とした遺伝子治療の基盤技術を提供することを目的とする。

現在、遺伝子治療の分野においては、標的細胞への遺伝子の導入効率及び導入された遺伝子の発現効率の面で克服すべき課題が多い。従って、遺伝子導入がなされた標的細胞のみを選択的に増殖させるシステムが確立されれば、大きな飛躍がもたらされることは、明らかである。特に、赤血球、白血球など多くの血液細胞の基となる細胞であり、遺伝子治療の標的細胞として最も好ましいとされる造血幹細胞に対し、かかるシステムが確立されれば、遺伝子治療の分野における貢献度は、非常に大きい。

本発明者らは、好中球を選択的に増殖させるサイトカイン（造血因子）として従来から考えられてきたG-CSFが、造血幹細胞の増殖をも引き起こし、このG-CSF受容体が活性化される際に、G-CSF受容体の二量体化がみられることに鑑み、遺伝子工学的手法を用いて工夫したG-CSF受容体の二量体化により、造血幹細胞を増殖させるシステムを想到した。また、エストロゲン刺激によりエストロゲン受容体が二量体化するという事に鑑み、G-CSF受容体遺伝子とエストロゲン受容体遺伝子のキメラ遺伝子を作製し、そのキメラ遺伝子を導入した細胞に対して外部から

エストロゲン刺激を与えることにより、強制的にキメラ遺伝子産物中のG-CSF受容体部分を二量体化させることを想到した。

即ち、本発明者らは、外部からのエストロゲン刺激により、キメラ遺伝子産物中のG-CSF受容体部分の活性化を引き起こし、遺伝子を導入した造血幹細胞を選択的に増殖させるシステムを新規に開発し、これを遺伝子治療の分野に応用すべく本発明を完成した。

本発明は、リガンドが結合する領域、該領域にリガンドが結合すると会合する領域、及び、会合すると細胞に増殖活性を付与する領域、とを含む融合タンパク質、該融合タンパク質をコードする遺伝子を含むベクター、該ベクターを含む細胞及びステロイドホルモンを作用させることにより該細胞を体内ないし体外で選択的に増殖させる方法等に関する。また、本発明は、該ベクターが外来遺伝子を含む場合は、該外来遺伝子が導入された細胞を選択的に増殖させる方法等に関する。

より具体的には、

- (1) (a) リガンドが結合する領域、(b) (a) の領域にリガンドが結合すると会合する領域、及び(c) サイトカイン受容体又はその一部からなり、会合すると細胞に増殖活性を付与する領域、を含む融合タンパク質、
- (2) 「サイトカイン受容体又はその一部からなり、会合すると細胞に増殖活性を付与する領域」が、G-CSF受容体に由来する、(1) 記載の融合タンパク質、
- (3) 「リガンドが結合する領域」がステロイドホルモン受容体に由来する、(1) 記載の融合タンパク質、
- (4) ステロイドホルモン受容体がエストロゲン受容体である、(3) 記載の融合タンパク質、
- (5) (1) 記載の融合タンパク質をコードする遺伝子を含むベクター、
- (6) (5) 記載のベクターを保持する細胞、
- (7) (6) 記載の細胞に対して、(1) 記載の融合タンパク質の「リガンドが結合するドメイン」に作用するリガンドを作用させて、(6) 記載の細胞を選択的に増殖させる方法、
- (8) (a) リガンドが結合する領域、(b) (a) の領域にリガンドが結合する

と会合する領域、及び(c)会合すると細胞に増殖活性を付与する領域、とを含む融合タンパク質をコードする遺伝子と所望の外来遺伝子、を含むベクター、

(9) 「会合すると細胞に増殖活性を付与する領域」がサイトカイン受容体に由来する、(8)記載のベクター、

(10) サイトカイン受容体がG-CSF受容体である(9)記載のベクター、

(11) 「リガンドが結合する領域」がステロイドホルモン受容体に由来する、(8)記載のベクター、

(12) ステロイドホルモン受容体がエストロゲン受容体である(11)記載のベクター、

(13) 「融合タンパク質をコードする遺伝子」と「外来遺伝子」とが同一の分子上に位置している(8)記載のベクター、

(14) 「融合タンパク質をコードする遺伝子」と「外来遺伝子」とが別々の分子上に位置している(8)記載のベクター、

(15) (8)～(14)のいずれかに記載のベクターを保持する細胞、

(16) (15)記載の細胞に対して、(8)記載のベクターに含まれる遺伝子がコードする融合タンパク質の「リガンドが結合するドメイン」に作用するリガンドを作用させて、(15)に記載の細胞を選択的に増殖させる方法、

(17) (a) (5)または(8)に記載のベクター、及び(b)該ベクターに含まれる遺伝子がコードする融合タンパク質の「リガンドが結合するドメイン」に作用するリガンド、を含むキット、

に関する。

本発明に用いられるリガンドは、特定のタンパク質に作用することにより該タンパク質を会合せしめるものであれば、特に制限はないが、ステロイドホルモンが好適である。ステロイドホルモンとしては、例えば、エストロゲン、アンドロゲン、プロゲステロン、グルココルチコイド、ミネラルコルチコイドなどが挙げられ、それぞれの受容体タンパク質との組み合わせで用いられる。また、本発明に用いられるサイトカイン受容体は、会合することによって細胞に増殖活性を付与するものであればよく、例えば、G-CSFなどサイトカイン受容体ファミリーに属するものや、c-kitやflk2/flt3などのようにチロシンキナーゼ受容体ファミリー

に属するもの等がある。

本発明の融合タンパク質における「細胞に増殖活性を付与する領域」としては、細胞内増殖シグナルを伝える分子、例えば、サイトカイン受容体分子全体を用いることが可能であるが、分子中の細胞に増殖活性を付与する領域のみを用いることも可能である。この場合、融合タンパク質遺伝子が導入された細胞の分化を起こさず増殖のみを起こすので、該細胞をそのままの形で増殖させる際に有利である。さらに、本発明において用いられるベクターには、融合タンパク質をコードする遺伝子を含む単一種分子のベクター、融合タンパク質と外来遺伝子の双方を含む単一種分子のベクターの他、融合タンパク質をコードする遺伝子を含むベクターと外来遺伝子を含むベクターの組み合わせからなる複数種の分子からなるベクター系、例えば、バイナリーベクター系も含まれる。この複数種の分子からなるベクター系は通常、共形質転換 (co-transformation) によって細胞に導入される。

なお、融合タンパク質をコードする遺伝子と外来遺伝子とを同一のベクターに挿入する場合には、IRES (internal ribosome entry site) (特表平6-509713号公報) を含むジシストロニックの形にすることができる。例えば、「5' - プロモーター - 外来遺伝子 - IRES - 融合タンパク質をコードする遺伝子 - 3'」の構成を有するベクター、又は、「5' - プロモーター - 融合タンパク質をコードする遺伝子 - IRES - 外来遺伝子 - 3'」の構成を有するベクターを用いることができる。該融合タンパク質遺伝子を発現している細胞のほぼ全てが外来遺伝子を発現しているようにするには、前者の形が一般に用いられる。

また、本発明において、ベクターの導入される細胞としては、造血幹細胞、リンパ系細胞、これら血球系以外の細胞などが挙げられる。特に、本発明は、自己複製能を有する造血幹細胞に好適に適用される。なお、本発明において細胞に導入される外来遺伝子については、特に制限はないが、遺伝子治療の分野においては、欠陥遺伝子に対応する正常な遺伝子を用いるのが有効である。

図面の簡単な説明

図1の(A)は、G-CSF受容体とエストロゲン受容体のキメラ分子 (GCRER) を示す

。(B)は、G-CSF受容体とエストロゲン受容体のキメラ分子のうち、G-CSF受容体の5番目から195番目のアミノ酸が欠失した変異体 (GCR Δ (5-195)/ER) を示す。(C)は、G-CSF受容体とエストロゲン受容体のキメラ分子のうち、G-CSF受容体の5番目から195番目及び725番目から756番目のアミノ酸が欠失した変異体 (GCR Δ (5-195,725-756)/ER) を示す。

図2は、G-CSF受容体とエストロゲン受容体のキメラ遺伝子を組み込んだレトロウイルスベクター「pMX」を示す図である。

図3は、「pMX-GCRER」を用いて形質転換したBa/F3細胞の増殖を経時的に示す図である。

図4は、「pMX-GCRER」を用いて形質転換したBa/F3細胞に対し、様々な濃度のエストラジオール刺激を与えた後の、Ba/F3細胞の増殖を経時的に示す図である。

図5は、「pMX-GCR Δ (5-195)/ER」を用いて形質転換したBa/F3細胞の増殖を経時的に示す図である。

図6は、プラスミド「pMX-GCRER-IRES-CD24」を示す図である。

図7は、プラスミド「pMX-GCR Δ (5-195)/ER-IRES-CD24」を示す図である。

図8は、プラスミド「pMX-GCR Δ (5-195,725-756)/ER-IRES-CD24」を示す図である。

図9は、「pMX-GCR Δ (5-195)/ER-IRES-CD24」を導入したBa/F3細胞におけるCD24の発現をフローサイトメトリーにより検出した図である。上は、「pMX-GCR Δ (5-195)/ER-IRES-CD24」を導入したBa/F3細胞での結果を示し、下は対照として用いた「pMX-GCR Δ (5-195)/ER」を導入したBa/F3細胞での結果を示す(なお、死細胞検出のために用いたヨウ化プロピディウムからのシグナルもデータに含まれている)。

図10は、「vMXGCRER」が導入された骨髓細胞により構成された顆粒球-マクロファージ系コロニーを示す顕微鏡写真である。

図11は、「vMXGCR Δ (5-195)/ER」が導入された骨髓細胞により構成された赤芽球系コロニーを示す顕微鏡写真である。

図12は、「vMXGCRER」が導入された骨髓細胞より分化したマクロファージをライトギムザ染色した顕微鏡写真である。

図13は、「vMXGCR Δ (5-195)/ER」が導入された骨髓細胞より分化した赤芽球をライトギムザ染色した顕微鏡写真である。

発明を実施するための最良の形態

〔実施例1〕 選択的増幅遺伝子であるG-CSF受容体/エストロゲン受容体キメラ遺伝子の作製

G-CSF受容体全体とエストロゲン受容体のリガンド（エストロゲン）結合領域のキメラタンパク質（以下、単に「GCRER」と称する）が産生されるように、それぞれのタンパク質をコードするcDNAの融合遺伝子を作製した（図1(A)）。次いで、G-CSFに対する反応性を欠いたキメラタンパク質を産生するために、「GCRER」に対応する融合遺伝子のうちG-CSF受容体の細胞外ドメインの5番目のGluから195番目のLeuまでの部分を除いた変異誘導体（以下、単に「GCR Δ (5-195)/ER」と称する）を作製した（図1(B)）。さらに該変異誘導体から、G-CSF受容体の分化誘導ドメイン(725~756)を含んだ部分を除いた変異誘導体（以下、単に「GCR Δ (5-195,725-756)/ER」と称する）を作製した（図1(C)）。

〔実施例2〕 選択的増幅遺伝子であるG-CSF受容体/エストロゲン受容体キメラ遺伝子が導入されたBa/F3細胞の単離

実施例1で作製した3種類の選択的増幅遺伝子をプラスミド「pCMX」（Cancer Res. 56: 4164(1996)）に組み込んで作成したプラスミド10 μ gを、ScaIにて直線化したブラストサイジン耐性遺伝子を有する「pSV2bsr」（科研製薬社製）1 μ gとともに、IL-3依存性細胞株であるBa/F3細胞に電気穿孔法にて導入した。次いで、電気穿孔施行後の細胞を5 \times 10⁵個ずつ24ウェルプレートに分配し、ブラストサイジン10 μ g/mlを含む培地で培養した。この結果、「pCMX-GCRER」を導入した場合は、17ウェル中11ウェルで、「pCMX-GCR Δ (5-195)/ER」の場合は、29ウェル中3ウェルで、「pCMX-GCR Δ (5-195,725-756)/ER」では、52ウェル中52ウェルで、ブラストサイジン耐性の細胞増殖がみられた。次いで、これらブラストサイジン耐性の細胞をウェルごとにIL-3で増殖させた後、IL-3の代わりにエストラジオール10⁻⁷Mを加えて培養を行ったところ、「pCMX-GCRER」を導入した場合は、11ウェル中7ウェルで、「pCMX-GCR Δ (5-195)/ER」の場合は、3ウェル中3ウェルで、「pCM

X-GCR Δ (5-195,725-756)/ER」の場合は、16ウェル中13ウェルで、IL-3非依存性・エストロゲン依存性の細胞増殖がみられた。なお、「pCMX-GCRER」の代わりにレトロウイルスベクターである「pMX」(Exp. Hematol. 24: 324(1996))に「GCRER」を挿入したもの(以下、単に「pMX-GCRER」と称する)(図2)を用いて同様の実験を行ったところ、各1細胞を含む24ウェル中2ウェルで、IL-3非依存性・エストロゲン依存性の細胞増殖がみられた。また、「pCMX-GCRER」を導入した細胞に対し、エストラジオールに代えて、1nMのG-CSFを加えたところ、G-CSFで増殖のあるウェルは、エストラジオールで増殖のあるウェルと一致した。さらに、プラスミド未導入のBa/F3細胞をコントロールとして用いたところ、G-CSF及びエストラジオールによる増殖は認められなかった。なお、目的の融合タンパク質が細胞内で生産されていることは、抗G-CSF受容体抗体又は抗エストロゲン受容体抗体を用いたウエスタンブロッティング法により確認した。

〔実施例3〕 エストラジオールによる細胞増殖の解析

実施例2で限界希釈法にて得たクローンのうち、エストラジオールに対する反応性の良いものを選択し、以下の実験(XTTアッセイ)に用いた。

まず、「pCMX-GCRER」を導入したBa/F3細胞にて検討を行った。この結果、G-CSF及びエストラジオール刺激にて、IL-3非依存性の細胞増殖が認められた(図3)。さらに、エストラジオール濃度を 10^{-14} ~ 10^{-7} Mの間で変化させて同様の実験を行ったところ、 10^{-9} ~ 10^{-7} Mの間で細胞増殖が認められた(図4)。これにより、 10^{-9} ~ 10^{-7} Mの間の濃度によるエストラジオール刺激により、細胞増殖シグナルが伝達されることが示唆された。

次いで、「pCMX-GCR Δ (5-195)/ER」を導入したBa/F3細胞にて検討をおこなった。この結果、G-CSF刺激による細胞増殖はブロックされ、エストラジオール刺激によってのみ細胞増殖が認められた(図5)。

同様に、「pCMX-GCR Δ (5-195,725-756)/ER」を導入したBa/F3細胞でも、エストロゲン刺激で細胞増殖が起こり、G-CSFに対する反応性は認められなかった。

〔実施例4〕 IRES-CD24発現プラスミドの作成

「pCMX-GCRER」をHindIII, EcoRIで切断し、ベクター断片(「断片1」)を回収した。また、「pCMX-GCRER」および「pCMX-GCR Δ (5-195)/ER」それぞれから、Hi

ndIIIとKpnI断片（それぞれ「断片2」:1672bp、「断片3」:1099bp）、EcoRIとKpnI断片（それぞれ「断片4」:1888bp、「断片5」:1792bp）を回収した。pBCEC(pBluescriptIIKSにEMCV由来のIRESとCD24を連結したもの, Migita, M., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 92: 12075(1995))をApoIにて消化し、IRES-CD24を含む断片（「断片6」:950bp）を回収した。「断片1」、「断片2」、「断片4」、および「断片6」をライゲーションし「pCMXGCRER-IRES-CD24」（図6）を、「断片1」、「断片3」、「断片4」、および「断片6」をライゲーションし「pCMX-GCR Δ (5-195)/ER-IRES-CD24」（図7）を、「断片1」、「断片3」、「断片5」、「断片6」をライゲーションし「pCMX-GCR Δ (5-195,725-756)/ER-IRES-CD24」（図8）を構築した。

〔実施例5〕 CD24の細胞内発現

Ba/F3をPBSにて2回、「OPTI-MEMI」（Gibco-BRL社製）にて1回洗浄した10'細胞を0.2mlの「OPTI-MEMI」に懸濁し、「pCMX-GCRER-IRES-CD24」、「pCMX-GCR Δ (5-195)/ER-IRES-CD24」、「pCMX-GCR Δ (5-195,725-756)/ER-IRES-CD24」をそれぞれ10mgずつ加え、「Gene Pulser」（BioRad社製）を用いて290V、960mFにて導入した。導入後、2日間10% FCS, 10U/ml mL-3（R & D SYSTEMS社製）を含むRPMI培地にて培養した。10'細胞を5%FCS/PBSにて洗浄後、1mg/ml 抗CD24抗体（Pharmingen社製）を室温30分反応させ、5%FCS/PBSにて2回洗浄後、1:20希釈したPE標識抗マウス抗体（DAKO社製）を室温30分反応させ、5%FCS/PBSにて2回洗浄した。5mg/ml ヨウ化プロピジウム(propidium iodide)/ PBS 1mlに懸濁し、フローサイトメトリ（Becton Dickinson）にて585nmのディテクターを用いてCD24の発現の解析を行った。この結果、「pCMX-GCR Δ (5-195)/ER-IRES-CD24」が導入された細胞では、多くの細胞でCD24の発現が検出された。なお、pCMX-GCR Δ (5-195)/ER-IRES-CD24」が導入された細胞の対照としては「pCMX-GCR Δ (5-195)/ER」が導入された細胞を用いた。結果を図9 および表1に示す。なお、死細胞検出のために用いたヨウ化プロピジウムからのシグナルもデータ値に含まれている。

表 1

導入プラスミド	抗CD24抗原(-)細胞	抗CD24抗原(+)細胞
pCMX-GCR Δ (5-195) /ER-IRES-CD24	59.77%	40.23%
pCMX-GCR Δ (5-195)/ER	85.10%	14.90%

〔実施例 6〕 プロジェニターアッセイ

6週齢C57BLマウス4匹に5-フルオロウラシル (5FU: 和光純薬社製) 生理食塩水溶液(10mg/ml)を300ml/匹静脈注射を行った。投与後2日目に、大腿骨より骨髓を採取し、「Lympholyte-M」(Cederlane社製)上にて遠心(1500rpm、25°C、22分)により単核球を単離した。20%FCS、100U/ml IL6、100mg/mlラットSCFを添加したイスコフ変法ダルベッコ基本培地(IMDM;Gibco社製)にて2日間培養した。CH296 (宝酒造社製、Hanenberg, H. et al.Nature Med. 2: 876(1996))をコートしたプレート(1146:ファルコン社製)上にて、IL6とSCFにて前刺激した骨髓細胞 10^6 を、エコトロピックパッケージング細胞株「GP+E-86」(J. Virol. 62: 1120(1988))に「pMX-GCRER」を組み込み培養上清に得られたレトロウィルス「vMXGCRER」、またはエコトロピックパッケージング細胞株「GP+E-86」に「pMXGCR Δ (5-195)/ER」を組み込み培養上清に得られたレトロウィルス「vMXGCR Δ (5-195)/ER」を 10^8 含む培養上清で懸濁し、IL6とSCFを添加し培養した。2, 24, 26, 36, 38時間後にウィルス上清を交換した。6回目のウィルス上清交換の24時間後、細胞を 10^4 /wellになるようにメチルセルロースを含む培地(IMDM, 1.2% メチルセルロース 1500cp;Wako, 20% FCS, 1% 脱イオン化BSA, 10mM 2-メルカプトエタノール, 10^{-7} M b-エストラジオール)にて培養した。10日培養後コロニーを顕微鏡観察した後、塗抹標本を作成しライトギムザ染色後、構成細胞の同定を行った。

この結果、「vMXGCRER」「vMXGCR Δ (5-195)/ER」が感染した骨髓細胞では、エ

ストラジオール刺激で分化した顆粒球-マクロファージ系コロニー、赤芽球系コロニーが観察された。エストラジオール刺激によって「vMXGCRER」感染骨髓細胞より形成された顆粒球-マクロファージ系コロニーを図10に示す。エストラジオール刺激によって「vMXGCRΔ(5-195)/ER」感染骨髓細胞より形成された赤芽球系コロニーを図11に示す。これらのコロニーの構成細胞を塗抹標本にしてライトーギムザ染色したところ、分化した血球細胞像が得られた。「vMXGCRER」感染骨髓細胞より形成された顆粒球-マクロファージ系コロニーの塗抹標本で観察されたマクロファージのにしてライトーギムザ染色像を図12に、「vMXGCRΔ(5-195)/ER」感染骨髓細胞より形成された赤芽球系コロニーの塗抹標本で観察された赤芽球のライトーギムザ染色像を図13に示す。

産業上の利用の可能性

本発明によって、外来遺伝子を導入した細胞を、外部刺激により選択的に増幅させることが可能となり、標的細胞への遺伝子の導入効率などが低い場合であっても、有効な遺伝子治療が行えるようになった。また、本発明における細胞の選択的増幅システムは、様々な血液細胞に適用が可能であるため、遺伝子治療の対象となる細胞の範囲の拡大が図られた。従って、本発明によって、特に遺伝子治療の分野において重要な基盤技術が提供された。

請求の範囲

1. (a) リガンドが結合する領域、(b) (a) の領域にリガンドが結合すると会合する領域、及び(c) サイトカイン受容体又はその一部からなり、会合すると細胞に増殖活性を付与する領域、を含む融合タンパク質。
2. 「サイトカイン受容体又はその一部からなり、会合すると細胞に増殖活性を付与する領域」が、G-CSF受容体に由来する、請求項 1 記載の融合タンパク質。
3. 「リガンドが結合する領域」がステロイドホルモン受容体に由来する、請求項 1 記載の融合タンパク質。
4. ステロイドホルモン受容体がエストロゲン受容体である、請求項 3 記載の融合タンパク質。
5. 請求項 1 記載の融合タンパク質をコードする遺伝子を含むベクター。
6. 請求項 5 に記載のベクターを保持する細胞。
7. 請求項 6 に記載の細胞に対して、請求項 1 記載の融合タンパク質の「リガンドが結合するドメイン」に作用するリガンドを作用させて、請求項 6 に記載の細胞を選択的に増殖させる方法。
8. (a) リガンドが結合する領域、(b) (a) の領域にリガンドが結合すると会合する領域、及び(c) 会合すると細胞に増殖活性を付与する領域、とを含む融合タンパク質をコードする遺伝子と所望の外来遺伝子、を含むベクター。
9. 「会合すると細胞に増殖活性を付与する領域」がサイトカイン受容体に由来する、請求項 8 記載のベクター。
10. サイトカイン受容体がG-CSF受容体である請求項 9 記載のベクター。
11. 「リガンドが結合する領域」がステロイドホルモン受容体に由来する、請求項 8 記載のベクター。
12. ステロイドホルモン受容体がエストロゲン受容体である請求項 11 記載のベクター。
13. 「融合タンパク質をコードする遺伝子」と「外来遺伝子」とが同一の分子上に位置している請求項 8 記載のベクター。
14. 「融合タンパク質をコードする遺伝子」と「外来遺伝子」とが別々の分子

上に位置している請求項 8 記載のベクター。

15. 請求項 8 ～ 14 のいずれかに記載のベクターを保持する細胞。

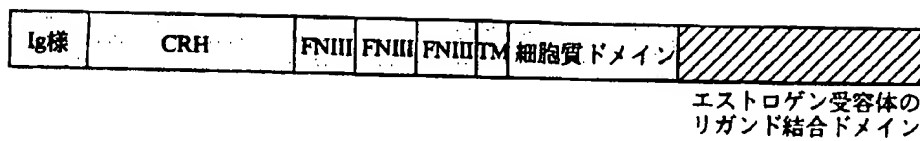
16. 請求項 15 に記載の細胞に対して、請求項 8 記載のベクターに含まれる遺伝子がコードする融合タンパク質の「リガンドが結合するドメイン」に作用するリガンドを作用させて、請求項 15 に記載の細胞を選択的に増殖させる方法。

17. (a) 請求項 5 または 8 に記載のベクター、及び (b) 該ベクターに含まれる遺伝子がコードする融合タンパク質の「リガンドが結合するドメイン」に作用するリガンド、を含むキット。

1 / 13

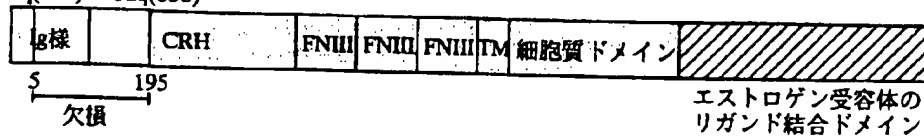
図 1

(A)



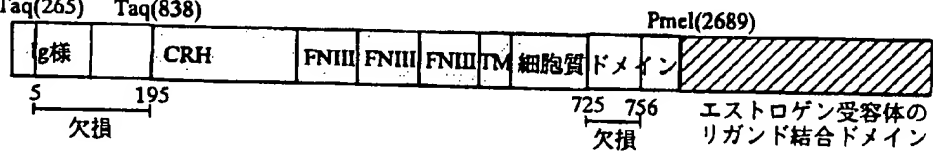
(B)

Taq(265) Taq(838)



(C)

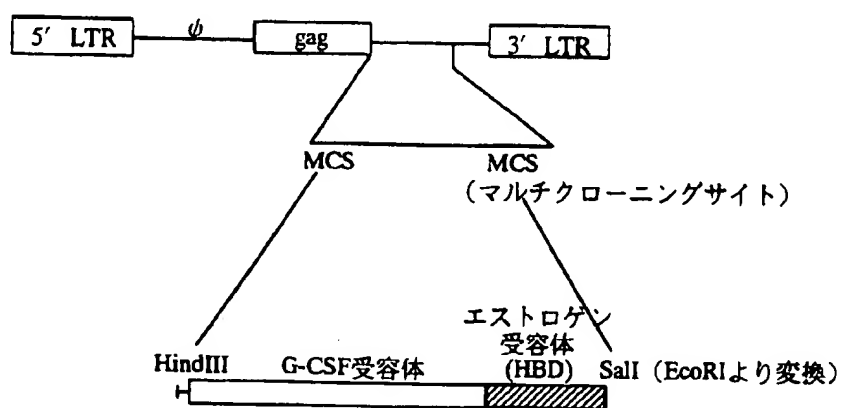
Taq(265) Taq(838)



2 / 13

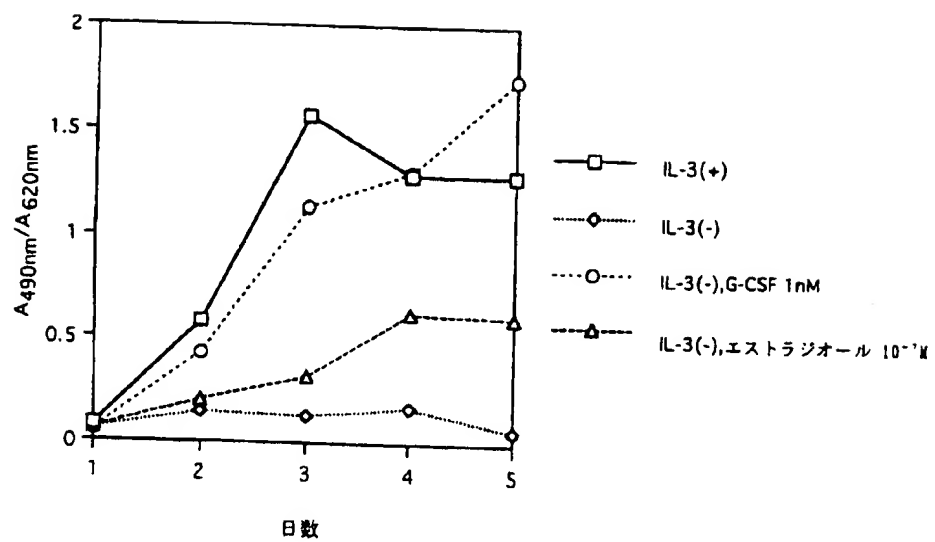
図 2

レトロウイルスベクター (pMX)



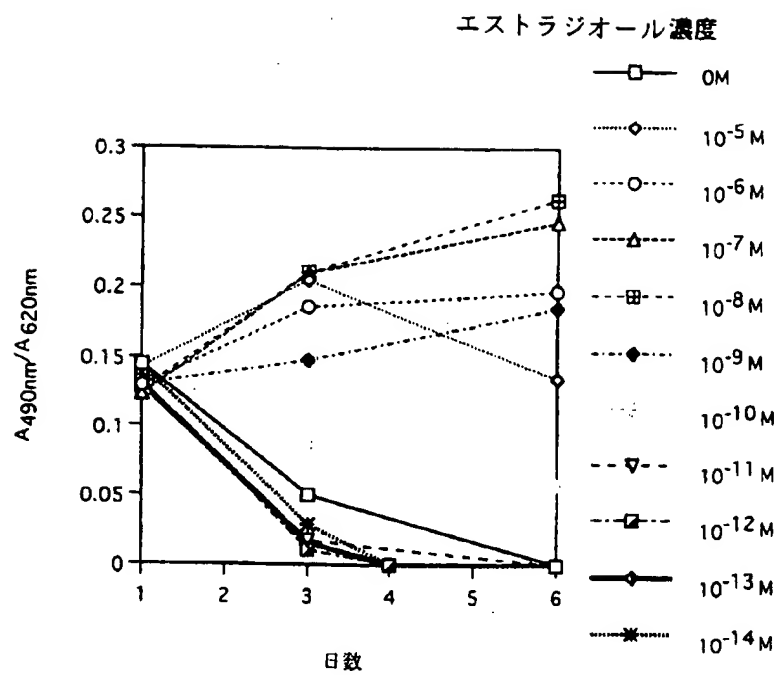
3 / 13

図 3



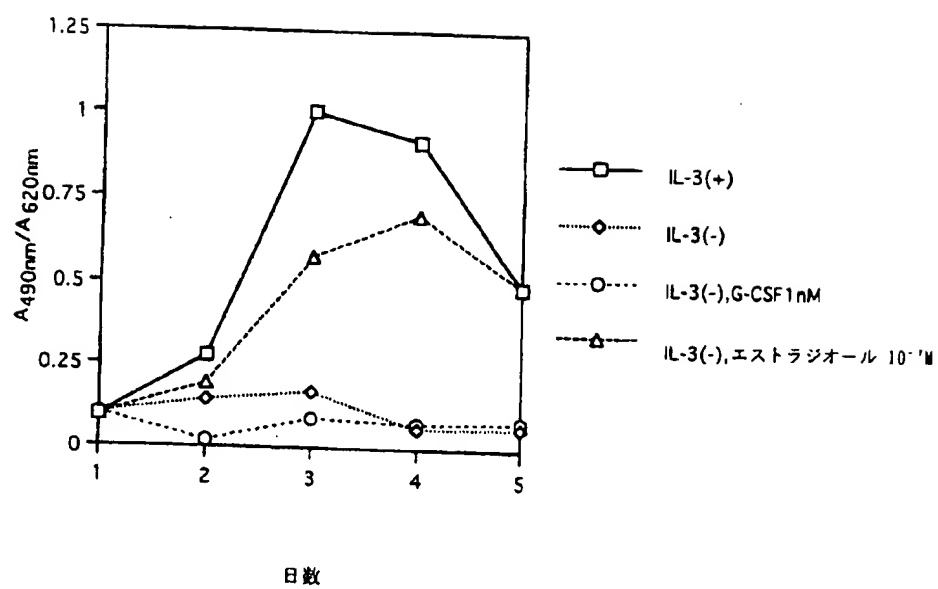
4 / 13

図 4



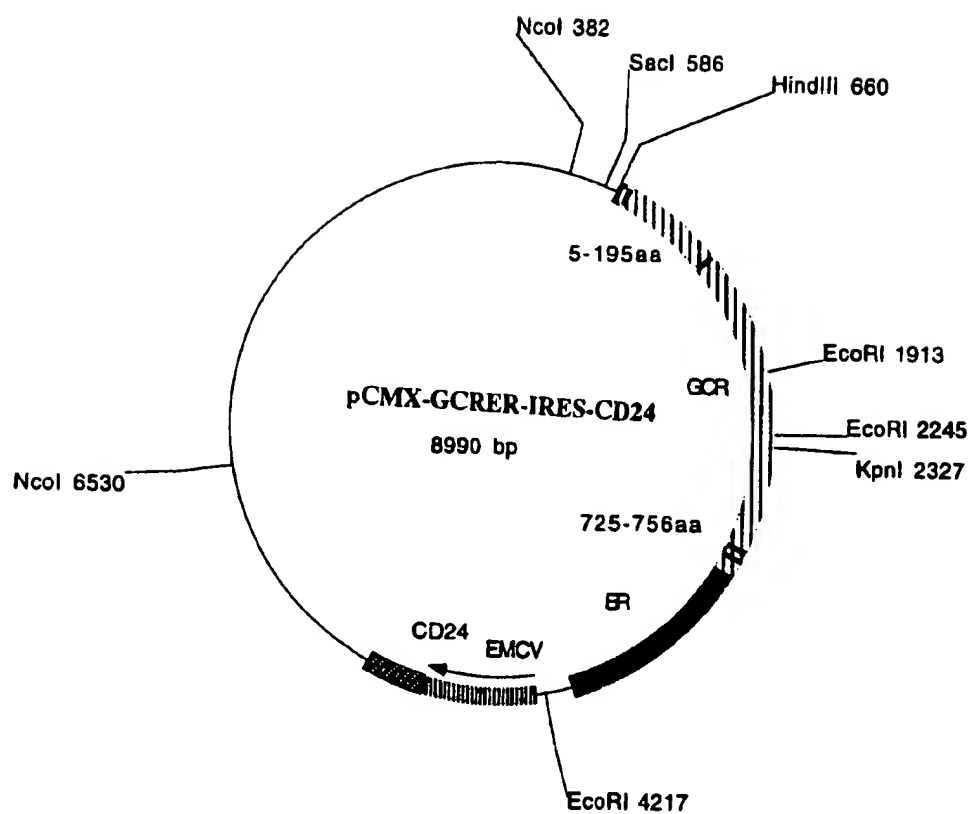
5 / 13

図 5



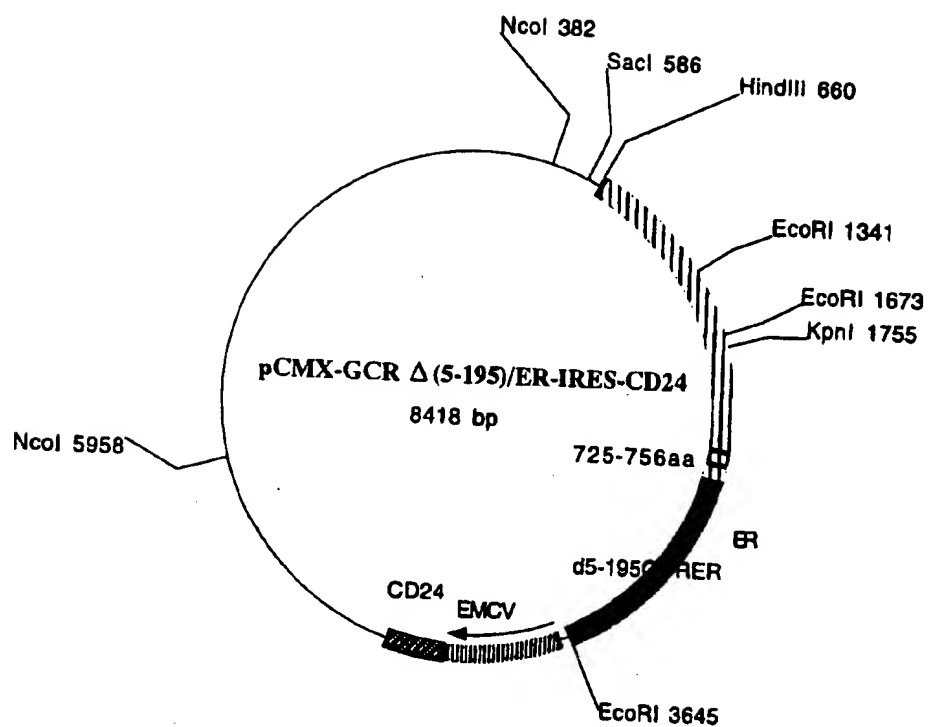
6 / 13

6



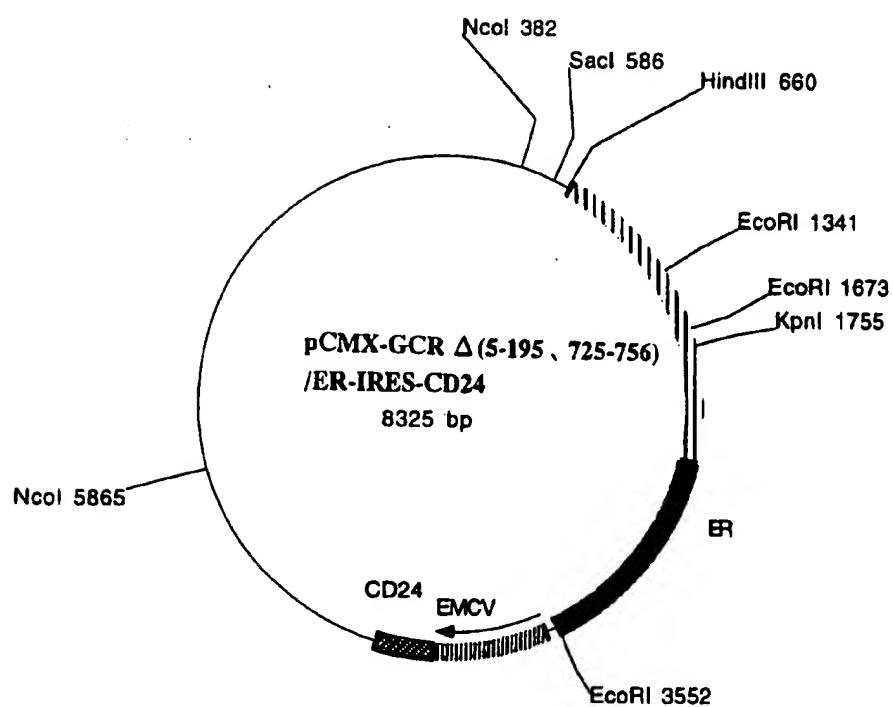
7 / 13

7



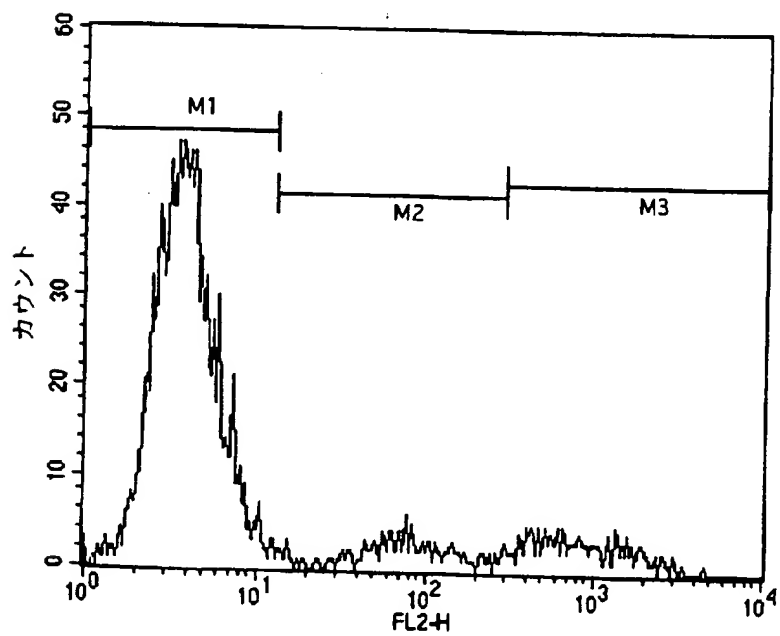
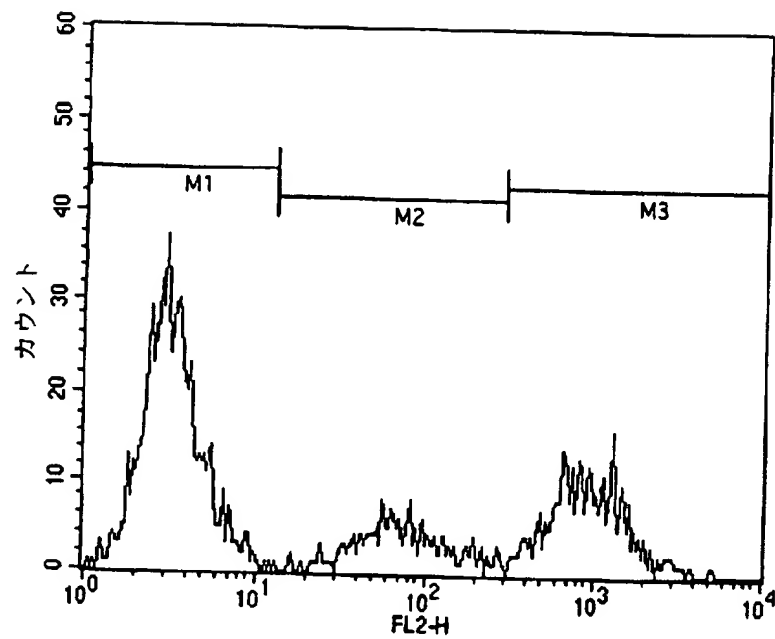
8 / 13

8



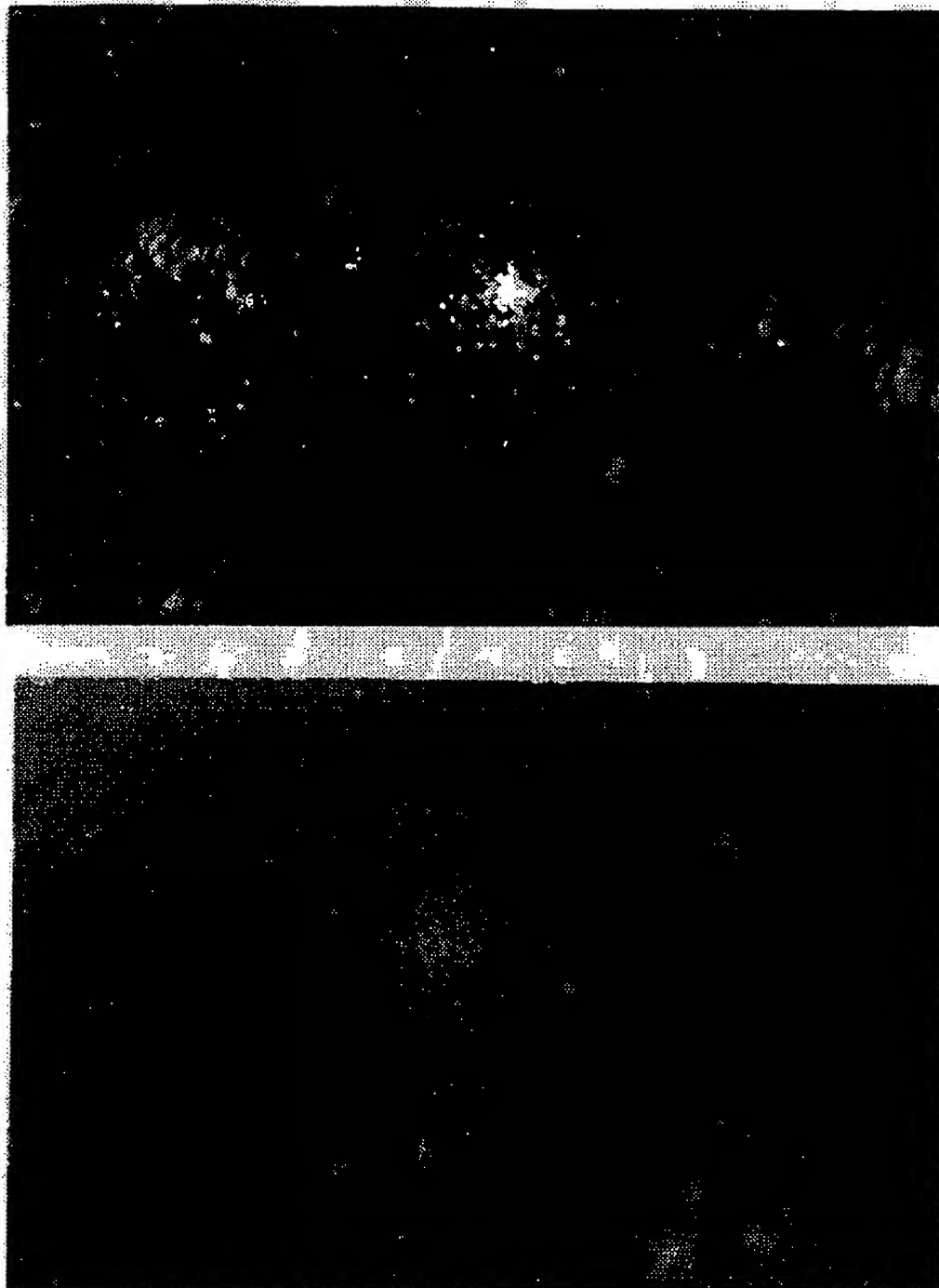
9 / 13

図 9



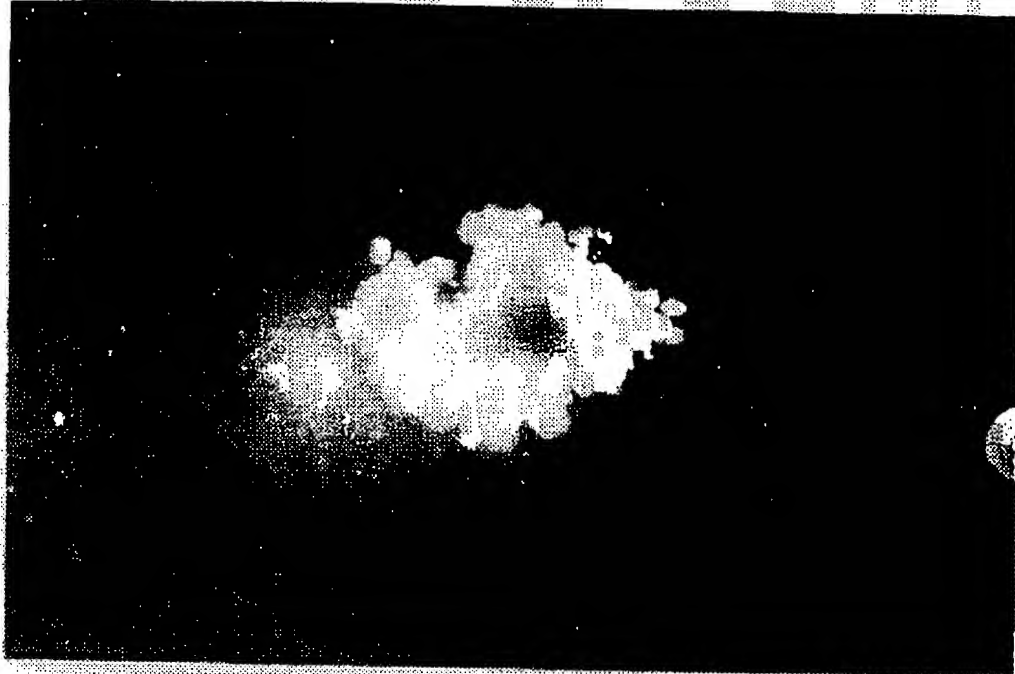
10/13

図 10



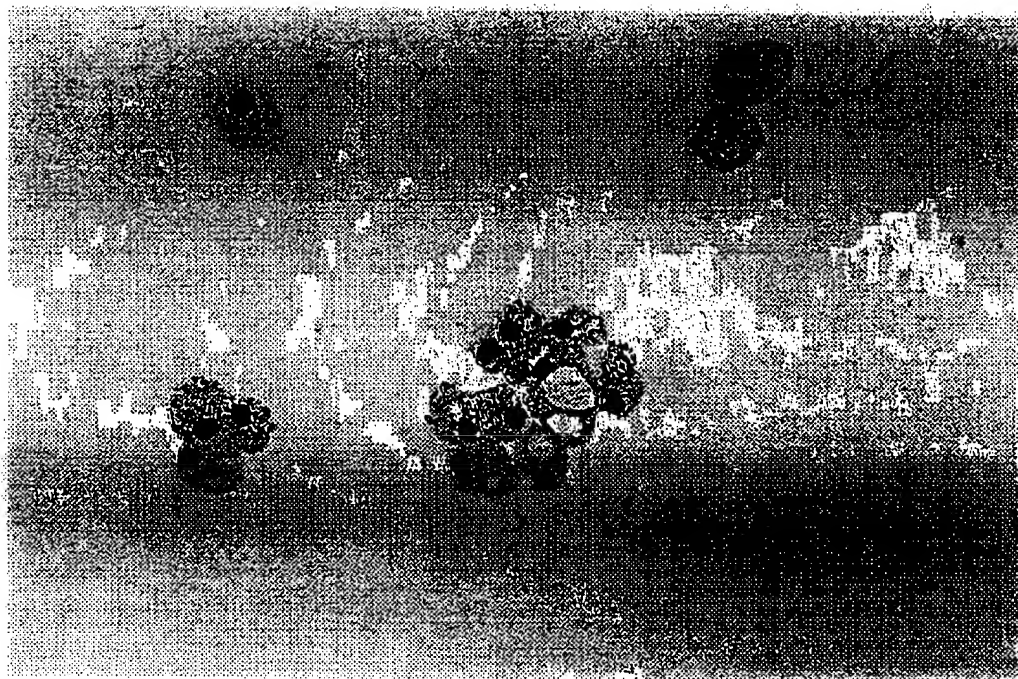
11/13

☒ 11



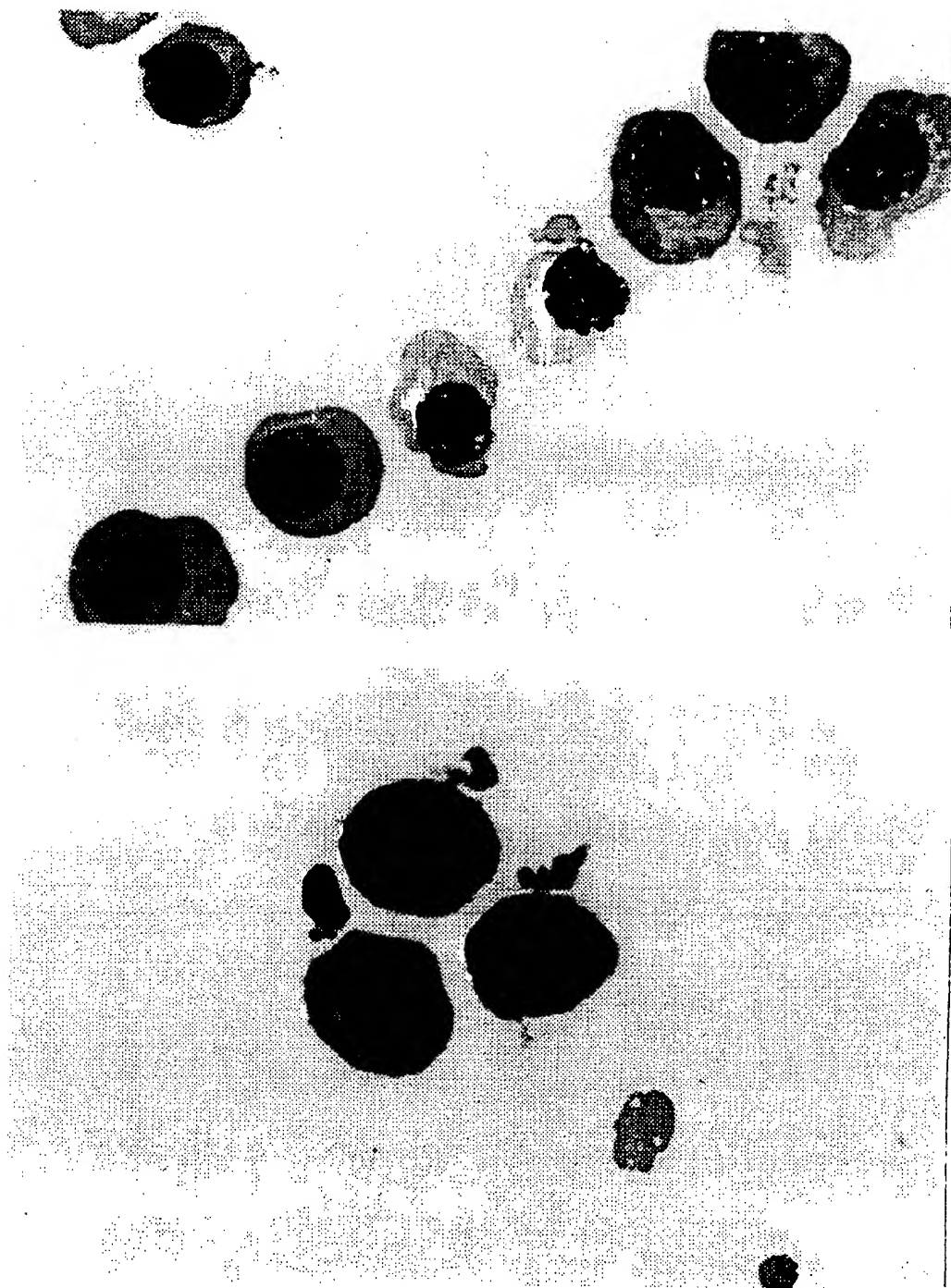
12/13

12



13/13

13



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/00687

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C12N5/10, C12N15/62, C07K19/00, C07K14/715, C07K14/72

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C12N5/10, C12N15/62, C07K19/00, C07K14/715, C07K14/72

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Peter J. et al. "Hormone-conditional transformation by fusion proteins of c-Abl and its transforming variants" EMBO J. (1993) Vol. 12, No. 7, p. 2809-2819	1 - 17
A	Nagata S. et al. "Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor" Prog. Growth. Factor Ref. (1991) Vol. 3, p. 131-141	1 - 17
PX	Ito K. et al. "G-CSFR-estrogen-R fusion cDNA as a novel selective amplifier gene for controllable expansion of transduced hematopoietic stem cells" Blood (1996, Dec.) Vol. 88, p. 137A	1 - 17
PX	Ozawa K. et al. "Development of a novel selective amplifier gene for in vivo selective expansion of transduced hematopoietic stem cells" Experimental Hematology (1996, Aug.) Vol. 24, No. 9, p. 1053	1 - 17

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

June 4, 1997 (04. 06. 97)

Date of mailing of the international search report

June 17, 1997 (17. 06. 97)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ¹ C12N5/10, C12N15/62, C07K19/00, C07K14/715, C07K14/72		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ¹ C12N5/10, C12N15/62, C07K19/00, C07K14/715, C07K14/72		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Peter J. et al. "Hormone-conditional transformation by fusion proteins of c-Ab1 and its transforming variants" EMBO J. (1993) 第12巻 第7号 p. 2809-2819	1-17
A	Nagata S. et al. "Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor" Prog. Growth Factor Res. (1991) 第3巻 p. 131-141	1-17
PX	Ito K. et al. "G-CSF-estrogen-B fusion cDNA as a novel selective amplifier gene for controllable expansion of transduced hematopoietic stem cells" Blood (1996, Dec.) 第88巻 p. 137A	1-17
PX	Ozawa K. et al. "Development of a novel selective amplifier gene for in vivo selective expansion of transduced hematopoietic stem cells" Experimental Hematology (1996, Aug.) 第24巻 第9号 p. 1053	1-17
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
04.06.97	17.06.97	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 平田 和男 印	4B 9549
	電話番号 03-3581-1101 内線 3449	

様式PCT/ISA/210 (第2ページ) (1992年7月)